

Wie wird die Viruskontrastfärbung durch gepufferte Formollösung beeinflußt?

von

PETER HILDEBRANDT

Frankfurt am Main 1963

1964

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt
und Universität Frankfurt am Main;
Direktor : Prof. Dr. Kurt Herzberg.

Wie wird die Viruskontrastfärbung
durch gepufferte Formollösung
beeinflusst ?

Inaugural-DiSSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin,

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Peter Hildebrandt
aus Frankfurt a. M.

Frankfurt am Main 1963.



Dekan : Prof. Dr. med. Frey.

Referent : Prof. Dr. med. Herzberg.

Korreferent : Prof. Dr. med. vet. Schoop.

Mündliche Prüfung : 28. Februar 1964.

Meinem Vater gewidmet.

Einleitung.

Der lichtmikroskopische Nachweis grosser, im Präparat sichtbarer Elementarkörperchen ist in der virologischen Diagnostik ein brauchbares Verfahren, das z. B. die wichtige Differentialdiagnose Variola gegen Varizellen ermöglicht. Herrn Professor H e r z b e r g, dessen zuletzt durch die Formolfixierung verbesserte Einfachfärbung mit Viktoriablauf die lichtmikroskopische Darstellung grosser Virusarten stark vereinfacht hat, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, welche eine ebenfalls von HERZBERG schon 1934 angegebene Kontrastfärbung mit Viktoriablauf, Kernechtrot und Lichtgrün behandelt.

Literatur.

1903 hat zuerst BORRELL im Pariser PASTEUR-Institut mit der LOEFFLERSchen Geisselfärbung das Virus der Geflügelpocken in Gestalt kleiner Kugeln dargestellt und Strongyloplasma avium genannt (strongylos gr. rund).⁺ PASCHEN in Hamburg färbte 1906 seine Pockenkörperchen ebenso, sowie mit langer GIEMSA-Färbung, und sah dabei auch Doppelkugeln, die damals als Teilungsformen aufgefasst wurden. 1934 hat Kurt HERZBERG in Düsseldorf Elementarkörperchen-Färbungen mit Viktoriablau bei mehreren Virusarten erhalten. Er berichtete darüber dem 2. Internationalen Mikrobiologenkongress (London 1936) : "Wohl kann man mit dem Löffler-Beize-Carbol-fuchsin-Verfahren sehr gute Bilder von den El.K. erhalten, wie es PASCHEN durch Photogramme gezeigt hat, aber in weniger geübten Händen kann die Zahl der Versager gross sein. Es sind daher viele Versuche unternommen worden, eine zu weniger Zweifeln Anlass gebende und vor allem technisch einfachere

⁺ Zur Vorgeschichte des färberischen Virusnachweises siehe über John BUIST (1887) im Handbuch der Virusforschung (1, S. 1/252).

Darstellungsmethode der El.K. zu finden⁺. Wir besitzen sie heute in der Färbung mit Viktoriablau 4 R hochkonz. Dieser Farbstoff der Triarylmethanreihe färbt bestimmte El.K. unmittelbar und bedarf dazu nicht einmal einer Beizung oder Fixierung der Ausstriche. Das ist bemerkenswert, denn bislang hatte man geglaubt, die El.K. nur nach besonders energischer Vorbehandlung (Beizung) färben zu können" (12), was allerdings wohl hinsichtlich der Langzeitfärbung mit GIEMSA-Lösung nicht streng zutrifft (13, S. 29, und 1, S. 1/266). Über das Viktoriablau schreibt HARMS in seinem Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie 1958 : "Seine heutige Bedeutung liegt auf dem Gebiete der Virusfärbung. Schon B. LIPSCHÜTZ (in KOLLE-KRAUS-UHLENHUTH, Handb.... 8, 337 (1930)) wies darauf hin, dass "Strongyloplasmen" nach Beizung (! d. Verf.) mit RUGE'scher, nach RUYS modifizierter Lösung mit Viktoriablau 4 R gefärbt, besonders distinkt hervortreten. Populär wurde diese Färbung aber erst durch K. HERZBERG (Zbl. Bakt. I Or. 130, 183, 326 (1933/34)), der das Variolavakzine- (Kuhpocken) und das Virus der Kanarienvogelkrankheit (KIKUTH) mit der 3 %igen Lösung unmittelbar anfärbte, ferner (ibid. 131, 358 (1934)) das Varicellen- und Ektromelie-Virus (Kontrastfärbung mit Kernechtrot und Lichtgrün)..." (4, S. II/315).

⁺ Unter anderem auch von TANIGUCHI und seinen Mitarbeitern. Nach unseren Nachprüfungen gelingt die Darstellung der El.K. mit seiner Methode viel weniger kräftig als mit dem Carbofuchsinverfahren. Oft sind die El.K. so blassrosa gefärbt, dass sie im Hellfeld nicht photographiert werden können. Die Färbung von TANIGUCHI ist daher nicht als Verbesserung der Carbofuchsinmethode zu betrachten, auch wenn die Bilder klarer als bei dieser ausfallen."

Die Entdeckung HERZBERGs geschah aber unabhängig von LIPSCHÜTZ als Folge einer Überlegung, über welche er in einer Arbeit "Licht- und elektronenmikroskopische Befunde am Kanarienvogelpockenvirus" (Archiv für experimentelle Veterinärmedizin 14, 75 (1959)) Näheres ausgeführt hat (16). Auch der ausdrückliche Verzicht auf eine Beizung in der ersten Veröffentlichung, die Verwendung von Verstärkern, zuerst Weinsäure, später Zitronensäure, unterscheidet die Viktoriablaufärbung HERZBERGs von einigen anderen Viktoriablaufärbungen.

1932 beschrieb KIKUTH zusammen mit dem Studenten GOLLUP eine übertragbare Kanarienvogelkrankheit, die heutigen Kanarienvogelpocken. Sie ist eine Zoonose, die KIKUTH bei Versuchen zur Chemotherapie der Vogelmalaria beobachtete, zunächst als Folge einer Virulenzsteigerung der verwendeten Plasmodienstämme ansah und schliesslich als besondere, vielleicht durch ein Virus hervorgerufene Krankheit erkannt hatte. HERZBERG gelang es bald darauf, das Virus in einer Kultur aus Hühnerembryonalgewebe und Tyrodelösung zu züchten. Mit der Karbol-fuchsinfärbung nach PASCHEN stellte er die Elementarkörperchen der Kanarienvogelpocken mikroskopisch und mikrophotographisch dar (7). Mikrophotographien verschiedener virusbefallener histiozytärer Kanarienvogelzellen reihte HERZBERG so aneinander, wie sie sich zu einem Bild der intrazellulären Virusentwicklung zwanglos fügen liessen: Zunächst sieht man im Protoplasma ein kleines helles Bläschen oder deren mehrere; dies wird grösser; Elementarkörperchen werden in ihm sichtbar; mit der Virusblase schwillt die ganze Zelle an; ihr Kern ist an den Rand gedrückt; schliesslich birst sie, und das Virus wird ausgestreut "wie Samen aus einer Kapsel" (8). Die Elementarkörperchen sind also

anfangs intrazellulär, und zwar in den Virusblasen, später extrazellulär verstreut zu finden. Nur solange die Blasen noch sehr klein sind, lässt sich Virus in ihnen nicht nachweisen. HERZBERG war damals Dozent im Düsseldorfer Hygienischen Institut. Im Pathologischen Institut von H. SCHLEUSSING vorgenommene Versuche mit gebräuchlichen Fettfärbungen ergaben, dass sich einzelne der intrazellulären Blasen schwach anfärben liessen. HERZBERG versuchte es nun mit dem ungebräuchlichen Fettfarbstoff (4, S. II/316 unten m. Lit.) "Viktoriablau 4 R", der nach J. SCHUMACHER aber ein besonders guter Lipoproteid-Färber ist, und hatte ein überraschendes Ergebnis: "Die Bläschen selbst blieben meist hell oder nahmen den Farbstoff nur wenig an, aber das Virus in ihnen und auch ausserhalb der Zellen färbte sich - ohne jede Beizung! - vollkommen scharf in Form dunkelblauvioletter Körperchen" (8). Die Formel des Viktoriablaus zeigt drei Kohlenwasserstoffringe, die durch ein Kohlenstoffatom verknüpft sind; "4 R" bedeutet eine stark rotstichige Marke (4, S. II/314 und I/7).

In jener Arbeit, in der HERZBERG die einfache Anfärbbarkeit des Kanarienvirus mit Viktoriablau mitteilt (8), erwähnt er: in derselben einfachen Weise, nur blasser, lasse sich auch das Variolavakzinevirus darstellen. Der bald darauf erschienenen ausführlichen Anweisung (9) ist zu entnehmen, dass die Kanarienvirus-Ausstriche fünf Minuten mit dreiprozentiger Farblösung gefärbt und dann in bestimmter Weise mit Aqua destillata gespült werden sollten, bei Variolavakzinevirus zudem eine Wässerung voranzugehen hatte. Ferner: Ektromelievirus lässt sich in zehn bis 20 Minuten

mit Viktoriablau färben, das Varizellenvirus mit einer erforderlichen Färbedauer von 20 Minuten deutlich langsamer als das Variolavakzinevirus. Färbeversuche wurden auch am Herpesvirus vorgenommen. Ausserdem wird berichtet, dass HERZBERGs Doktorand SCHWEGMANN (Dissertation liegt nicht vor) eine Verstärkung der Viktoriablaufärbung ausgearbeitet hat : vorausgehende Behandlung der Ausstriche mit gesättigter Weinsäurelösung und Zusatz von Weinsäure zur Farblösung.

In der Arbeit "Viktoriablau zur Färbung von filterbarem Virus (Pocken-, Varizellen-, Ektromelia- und Kanarienvogelvirus)" (9) hat HERZBERG seine K o n t r a s t f ä r b u n g beschrieben. Es wurde mit den d r e i Farbstoffen Kernechtrot (2), Lichtgrün und Viktoriablau zellenhaltiges Ausstrichmaterial von Kanarienvogel- und Variolavakzinevirus gefärbt und das Ergebnis mit einer Farbtafel belegt. Die wegen der Verwendung nur e i n e s Farbstoffes einfachere Viktoriablau- färbung nach HERZBERG (E i n f a c h f ä r b u n g) erfuhr im Laufe der Zeit Erweiterungen ihrer Anwendbarkeit und verbessernde Abwandlungen. Früh schon wurde die färberische Unterscheidbarkeit des Pocken- vom Windpockenvirus erkannt (10). Noch im selben Jahr 1934 sind zehn Virusarten mit Viktoriablau gefärbt worden, nachdem die farbverstärkende Wirkung eines einfachen Zusatzes von Zitronensäure erkannt worden war (11). In einer von HERZBERG referierten Dissertation von 1936 (23) ist die Technik mit Zitronensäurezusatz ausführlich angegeben. Die in einer weiteren Arbeit aus jener Zeit (12) kurz erwähnte Farbverstärkung durch Vorbehandeln mit Kaliumpermanganatlösung fand in HERZBERGs Beitrag zum Handbuch der Viruskrankheiten von 1939 (13) über färberische Virusdarstellung Aufnahme,

auch eine Verbesserung durch Wasserstoffsuperoxyd, nicht jedoch seine Kontrastfärbung. 1954 gibt er als eine Ergänzung der Einfachfärbung (14) das vorherige Fixieren durch gepufferte Formollösung an mit den Vorteilen kräftigerer Elementarkörperchenfärbung, klareren Ausstrichgrundes und rascherer Herstellbarkeit der Präparate. 1959 stellt HERZBERG im Zentralblatt für Bakteriologie die Technik der Elementarkörperchenfärbung mit Viktoria-blau nochmals zusammenfassend dar (Formolfixierung, Zitronensäurezusatz, neue Lieferfirma für Viktoria-blau) und schlägt vor, dieses einfache und rasche Untersuchungsverfahren, dessen Brauchbarkeit u. a. von HERRLICH und von DOWNIE bezeugt wird, zur Variola-Diagnose stets anzuwenden (17).

Während in dem von HENNEBERG und KÖHLER 1961 herausgegebenen Praktikum der Virusdiagnostik (5) HERZBERGs Einfachfärbung Eingang fand, ist in WINKLES mikrobiologischer und serologischer Diagnostik (25, S. 191) unter der Überschrift "Viktoriaablaufärbung nach Herzberg" zudem "eine gute Kontrastfärbung" angegeben : Das Rezept von 1934 in ungenauer Wiedergabe. Und zwar fehlen gerade die von HERZBERG als die Spitze der Färbung bezeichneten Handlungen 4 und 6 der Originalvorschrift. KÜHN hat die Kontrastfärbung fälschlich WINKLE zugeschrieben und mit ihr angeblich bessere Resultate erzielt als mit der Einfachfärbung (ältester Art ?) (20, 15). Ob die Formolfixierung, die jüngst HERZBERGs Einfachfärbung weiter verbesserte, auch bei seiner alten Kontrastfärbung günstig ist, sollte in meiner Arbeit untersucht werden.

Material und Methodik.

Dreiundsiebzig lichtmikroskopische Präparate mit Kanarienspockenvirus von neun Vögeln wurden so gefärbt, wie es aus der beigegebenen tabellari-schen Beschreibung der Versuche in Verbindung mit den nachstehenden Zitaten und Erläuterungen er-sichtlich ist. Vorausgegangen ist die Einfach-färbung mehrerer Viruspräparate zum Erwerb einer gewissen technischen Fertigkeit.

Gewinnung der Präparate : "Ein mit dem Virus in den Brustmuskel geimpfter Kanarienvogel wurde kurz vor dem Tode (6. - 8. Tag) mit Aether ge-tötet....Nach Entfernung der Federn und der Haut sieht man auf der Brustmuskulatur ein gelbliches Oedem. Mit Pinzette und Schere zieht man noch das oberste Bindegewebshäutchen fort; dann kann man Ausstriche anlegen. Man berührt das Oedem mit der Fläche eines gut entfetteten Objektträgers und zieht den Tropfen mit der Kante eines geschlif-fenen Deckgläschens in der gleichen Weise aus, wie es bei Blutausstrichen zur Differential-zählung üblich ist. 24 Std. an der Luft trocknen lassen" (9, S. 359). Ausser Ausstrichen wurden auch Tupfpräparate verwendet.

Die Formolfixierung bei der Einfachfärbung mit Viktoriablau (Vorschrift von 1959) : "Da...die Elementarkörperchenfärbung mit Viktoriablau 4 R im Laufe der Jahre Ergänzungen erfuhr,...die

Lieferung des besonderen Farbstoffes von den Bayer-Werken, Leverkusen, an E. Merck, Darmstadt, übergang..., sei die jetzige Handhabung nachstehend beschrieben....Die Ausstriche an der Luft trocknen lassen. Keine Flammenfixierung. Am besten am gleichen Tag mit gepufferter Formollösung bedecken und diese 10 Min. einwirken lassen (Rezept s. unten). Mit Wasser gut abspülen, trocknen lassen. Die Fixierung ist damit beendet....Vor der Färbung wird die Farbe durch angefeuchtetes Filtrierpapier von leichtem Filtriervermögen filtriert. Unmittelbar vor der Färbung gibt man zuerst 0,5 ml einer gesättigten Zitronensäurelösung in ein Reagenzglas, dann 10 ml filtrierte Viktoriablaulösung dazu, mischt mit der Pipette gut durch und färbt 10 Min. lang. Danach abgiessen und in zwei Gläsern in Wasser kräftig abspülen, je Glas etwa 5 Sekunden....Herstellung der 3 %igen Viktoriablaulösung : 6 g "Viktoriablau 4 R zur Virusfärbung nach HERZBERG" (von E. Merck, Darmstadt) werden in einem Erlenmeyerkolben, der schon 200 ml Aqua dest. enthält, eingetragen (nicht umgekehrt !). Wiederholt gut umschütteln, bis zum nächsten Tag bei Zimmertemperatur stehen lassen, erst dann, nach erneutem Umschütteln, 1 Std. im Wasserbad auf 60° C erwärmen. Auch hierbei bewegt man den Kolben noch einige Male. Langsam abkühlen lassen. ...Herstellung der gesättigten Zitronensäurelösung : Man trägt etwa 200 g kristallisierte Zitronensäure in 100 ml Aqua dest. ein und lässt mehrere Tage unter wiederholtem Umschütteln stehen, bis ein ungelöster Bodensatz bleibt....Herstellung der gepufferten Formollösung....:

...Formaldehydlösung (Formal)

Merck etwa 40 Vol. % H·CHO	100,0 ml
Aqua dest.	300,0 ml
...	...

...m/15 Phosphatpufferlösung

pH 7,4 (40 ml KH_2PO_4 + 160 ml Na_2HPO_4) nach SÖRENSEN	200,0 ml
0,85 % NaCl-Lösung	200,0 ml
...	...

...= 800 ml gepufferte Formollösung....

Herstellung der "m/15 Phosphatpufferlösung" siehe im Original (17).

Die Viruskontrastfärbung nach HERZBERG : "Der Objektträger wird - im Gegensatz zur Einfachfärbung - 10 Min. in Aqua dest. gewässert, 1 Std. an der Luft getrocknet. Es schliesst sich folgende Färbung an :

1. 0,1proz. Kernechtrotlösung, 15 Min.
2. 30 Sek. abspülen mit Aqua dest.,
in einem zweiten Glas 30 Sek. klar spülen,
 $\frac{1}{2}$ Std. an der Luft trocknen lassen.
3. 1proz. Lichtgrünlösung, 2 Min.
4. 5 Sek. eintauchen in Aqua dest.,
5 Sek. klar spülen in einem zweiten Glas
Aqua dest.
5. 10proz. Weinsäurelösung 3 Min.
6. Abgiessen, dann wie 4.
7. 0,1proz. Viktoriablaulösung, 20 Sek.
8. Abgiessen, dann wie 4.
9. An der Luft trocknen lassen.

Herstellung der Farblösungen.

1. Kernechtrotlösung (nach Domagk). 5 g Aluminiumsulfat werden in 100 ccm Aqua dest. heiss gelöst, durch Papier filtriert. Hierin 0,1 g stand. Kernechtrot unter Kochen lösen, wieder filtrieren. Dann 0,5 ccm 10proz. Essigsäure zufügen.

2. Lichtgrün. 1 g standard. Lichtgrün in 100 ccm Aqua dest. kalt lösen. Dann 0,5 ccm 10proz. Essigsäure zufügen.

3. Viktoriablau 4 R 0,1proz. Die Lösung wird aus der 3proz. Stammlösung stets frisch bereitet. Auf 10 ccm der verdünnten Farbe 0,5 ccm 10proz. Weinsäure zufügen.

Ich habe mit "standard. Bayer" bezeichneten Farbstoffen der Firma Hollborn (Leipzig) gefärbt. ...Die Klippe der Färbung liegt bei Handlung 4 und 6. Beide Male sind die Zeiten genau innezuhalten. Eine längere Wässerung würde das Lichtgrün mehr und mehr auswaschen. Bei Innehaltung der Vorschrift erhält man sehr kontrastreiche Bilder mit leuchtenden Zellfärbungen" (9).

Für die vorliegende Arbeit wurden Farben der Fa. E. Merck AG verwendet. Die Herstellung der Viktoriablau-Stammlösung erfolgte nach der Vorschrift von 1959 (s. oben), die Trocknung nach der initialen Wässerung und nach Handlung 2 entweder an der Luft oder im Brutschrank.

Die praktische Durchführung dieser experimentellen Arbeit geschah unter Aufsicht und Anleitung des Institutsdirektors; über die Herstellung eines jeden Farbpräparates wurde auf eigenen Formblättern ein ausführliches Protokoll geschrieben. Zeitraubend und mühsam war die mikroskopische Durchmusterung; sie erforderte bis zu einer Stunde Zeit je Präparat.

Eigene Untersuchungen.

(Die nachstehenden Angaben sind als Ergänzung zu der beigefügten Tabelle anzusehen.)

Präparate 1 bis 8 : Versuch, die 1934 beschriebenen sehr kontrastreichen Bilder mit leuchtenden Zellfärbungen zu reproduzieren. Mit den jetzt verwendeten Farbstoffen der Fa. E. Merck AG war die Kontrastfärbung für Kernechtrot und Lichtgrün gut, die Elementarkörperchenfärbung zu blass (Pr. 6). Intra- und extrazelluläres Virus liess sich feststellen (Pr. 8). Alle Präparate stammten von demselben Kanarienvogel.

Präparate 9 bis 19 : Verbesserung der Elementarkörperchenfärbung durch Verlängern der Färbedauer des nach der Vorschrift von 1934 verdünnten und mit Weinsäure versetzten Viktoriablaus. Die Färbedauer wurde schrittweise heraufgesetzt, bei den Präparaten 9 und 11 ceteris paribus, bei den Präparaten 12 bis 14, 16, 18 und 19 unter gleichzeitiger Herabsetzung der Wässerungsdauer bei den Handlungen 4, 6 und 8 von fünf auf vier Sekunden. Präparat 16 war bezüglich Virus das bisher bestgefärbte, das Kernechtrot darin zu überdeckt. Anzumerken ist, dass Präparat 10 wiederholungsbedürftig, Präparat 15 eine Wiederholung mit Virus eines anderen Vogels war und Präparat 17 eine Wiederholung mit abschliessender Phosphormolybdänsäurebehandlung (nach MAY).

Präparate 20 und 21 : Hier wurde die Formolfixierung angewendet. In Präparat 20 (mit initialer Wässerung) kam das Rot etwas besser heraus als in Präparat 16, die Elementarkörperchenfärbung nicht. Auch in Präparat 21 (ohne initiale Wässerung) war die Kernsubstanz deutlicher rot, schön lachsrosa in Histiozyten, in Erythrozyten zum Teil leuchtend. Die Elementarkörperchen in einer Vakuole gut hellviolett. Das freie Gesichtsfeld dieses Tupfpräparates nicht gut, vielfach feinschaumig.

Präparate 22 und 23 : Zur weiteren Verstärkung der Elementarkörperchenfärbung wurde Zitronen- statt Weinsäure zugesetzt. Zu 6 ml der nach alter Vorschrift verdünnten Viktoriablau-Stammlösung wurden bei Präparat 22 statt der Weinsäure 0,3 ml einer kalt-gesättigten Zitronensäurelösung zugegeben, bei Präparat 23 0,3 ml einer Mischung aus einem Raumteil einer kalt-gesättigten Zitronensäurelösung und neun Raumteilen Aqua destillata. Präparat 22 ergab eine sehr schön violette Virusfärbung, die bis dahin kräftigste. In Präparat 23 waren die Elementarkörperchen etwas blasser als in Präparat 22, Kernechtrot und Lichtgrün sehr kräftig, Erythrozytenkerne leuchtend rot.

Präparate 24 bis 29 : Gegenüberstellung von drei T u p f präparaten (Nr. 24 bis 26) und drei A u s s t r i c h e n von demselben Kanarienvogel, Viktoriablaufärbung wie bei Präparat 22. Ergebnis : Für die nächsten Versuche sollen Tupfpräparate verwendet werden, denn die Ausstrichpräparate sind sehr blass. Nr. 24 : Elementarkörperchen recht intensiv, allgemeine Violettffärbung etwas zu stark, Rotfärbung zu schwach. Nr. 26 : Elementarkörperchen

gut, Kerne zu stark überdeckt (violett). Anzumerken ist, dass bei diesem Präparat die Trocknung bei Handlung 2 versehentlich 21 statt 30 Minuten betrug.

Präparat 30 : Missglückter Versuch einer Simultanfärbung.

Präparate 31 bis 34 : Versuch einer Verbesserung der Rotfärbung durch Verkürzen der Färbedauer des überdeckenden Viktoriablaus (vergleiche Präparate 9 bis 19). Das Rot bleibt auch bei 30 Sekunden Färbedauer zu blass, während die Elementarkörperchen kräftig genug sind. Das Grün ist auffallend kräftig in Nr. 34.

Präparate 35 bis 39 : Wie Nr. 21 in Verbindung mit Nr. 23 gefärbt unter Darstellung der Färbestufen. Nr. 38 mit, Nr. 39 ohne Weinsäurebeizung nach der Grünfärbung. Präparat 39 : Besonders starker Rot-Grün-Kontrast, aber Viktoriablauf zu schwach, Elementarkörperchen nur angedeutet. Präparatfehler : Es finden sich sehr merkwürdige, violettblauen Öltropfen ähnliche, verschieden grosse Gebilde in diesem Präparat. Bedingt durch das Weglassen der Beizung mit Weinsäure ?

Präparat 40 : Wie Nr. 23.

Präparate 41 bis 51 : Weitere Versuche über die Rot- und Grünfärbung in formolfixierten Präparaten. Die Nummern 43 bis 45 (Rotfärbung) entsprechen den Nummern 46 bis 48 (Grünfärbung) : Erstes Präparat einfache Rot- bzw. Grünfärbung, zweites Präparat Färbung plus Weinsäurebeizung, drittes Präparat Färbung plus Zitronensäurebehandlung, d. h. fünf

Minuten langes Einwirkenlassen einer Mischung aus 0,25 ml einer kalt-gesättigten Zitronensäurelösung und 5 ml Aqua destillata entsprechend dem Zitronensäurezusatz zum Viktoriablau ab Präparat 22. Ergebnis : Das Rot scheint unter der Säurebehandlung abzublassen, das Grün nicht. Anmerkung : Die Nummern 41 und 42 wurden nicht mit Weinsäure gebeizt; Nr. 42 (wie 39) : das Rot ist deutlich, vor allem in den Erythrozyten, aber auch in den Histiozyten. Nr. 49 wie Nr. 47 gefärbt, jedoch mit einer älteren Lichtgrünlösung. Die Nummern 50, 51 und alle folgenden sind Ausstrichpräparate (vergleiche Nr. 24 ff), nachdem das Grün in Tupfpräparaten wie Nr. 34 unnötig kräftig ausgefallen war (vergleiche auch die Bemerkung über das Lichtgrün in der - für Ausstriche formulierten - Vorschrift von 1934).

Präparate 52 bis 56 : Heraufsetzung der Wässerungsdauer bei den Handlungen 4, 6 und 8 auf den ursprünglichen Wert (vergleiche Nummern 9 bis 29), abschließender Vergleich der mit gepufferten Formollösungen fixierten und nicht fixierten Präparate. Nr. 52 wurde das bisher mit Abstand beste Präparat. Protokollnachschrift s. weiter unten. Die Nummern 53 und 54 waren fixiert, die Nummern 55 und 56 unfixiert : Bessere Elementarkörperchen- und schlechtere Lichtgrünfärbung bei den fixierten Präparaten im Vergleich zu den unfixierten. Für das Kernechtrot erwies sich hier die Formolfixierung als nicht so eindeutig günstig wie in früheren Präparaten. Im übrigen ergab sich durch die Weinsäurebeizung der Nummern 53 und 55 kein überzeugender Vorteil gegenüber den Vergleichspräparaten 54 und 56.

Präparate 57 bis 73 : Wiederholung vor allem der Technik von Präparat 52. Protokollnachschrift zu Nr. 52 : Der durch eingeritzte Kennzeichen unverwechselbargemachte Objektträger wurde für zehn Minuten in die "Formalin gepuffert pH 7,2" enthaltende Küvette gestellt und anschliessend ungefähr eine halbe Minute lang unter einem schwachen Strahl von Leitungswasser abgespült. Ungefähr fünf Milliliter der Kernechtrotlösung wirkten dann für fünf Minuten auf das Präparat ein. Wässerung je 30 Sekunden lang in dem 1. und in dem 2. Aqua dest.-Glas unter Hin- und Herbewegen des Objektträgers. Ungefähr 5 ml der Lichtgrünlösung; abgegossen nach zwei Minuten. Sofort anschliessend wurde der Objektträger fünf Sekunden lang in das 3. Aqua dest.-Glas gehalten und fünf Sekunden lang in dem 4. Aqua dest.-Glas hin- und herbewegt. Vorher waren eine kleine Menge Viktoriablau-Stammlösung durch trockenes Filtrierpapier filtriert und 0,2 ml Filtrat in ein 5,8 ml Aqua dest. enthaltendes Reagenzglas eingebracht worden. Vermischung dieser verdünnten Viktoriablaulösung mit 0,3 ml einer bei Zimmertemperatur gesättigten Zitronensäurelösung. Einwirkung der Farblösung auf das Präparat für fünf Minuten. Sofort anschliessend wurde der Objektträger fünf Sekunden lang in das 5. Aqua destillata-Glas gehalten und dann fünf Sekunden lang in dem 6. hin- und herbewegt. Aufstellung zum Trocknen. Die in der vorstehenden Protokollnachschrift genau festgehaltene, an Arbeitsgängen reiche Technik einer d u r c h F o r m o l - P u f f e r - F i x i e r u n g modifizierten Kontrastfärbung nach HERZBERG ergab gute Farbpräparate, aber nicht mit der wünschenswerten Regelmässigkeit.

Besprechung der Ergebnisse.

Wie wirkt sich die Fixierung mit gepuffelter Formollösung auf die Kontrastfärbung der Elementarkörperchen nach der Methode von HERZBERG aus ? Die Beantwortung dieser Frage erwies sich als schwierig. Es gelang zunächst nicht, nach HERZBERGs Anweisungen von 1934 die damaligen Ergebnisse sofort zu reproduzieren : Die Elementarkörperchen waren zu blass, vielleicht bedingt durch die heute erhältlichen Farben.

Es wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit Versuche unternommen, das Virus kräftiger zu färben. Nahelegend war es, (1.) die Färbezeit für Viktoria-blau zu verlängern. Dies bewährte sich. Bei 42 der 73 Präparate betrug die Färbedauer 5 Minuten statt 20 Sekunden.

Bei 29 Präparaten wurde (2.) die Differenzierungszeit verkürzt, um ein Auswaschen der Farben zu vermeiden. Es zeigte sich jedoch später, dass man ruhig - wie ursprünglich angegeben - zweimal fünf Sekunden lang wässern darf. Vorübergehend fanden nur (3.) Tupfpräparate Verwendung (Pr. 30 bis Pr. 49); sie scheinen sich kräftiger als Ausstriche anzufärben.

Seit 1934 ist für die Einfachfärbung nach HERZBERG die farbverstärkende Wirkung eines Zusatzes von Zitronensäure zum Viktoriablau bekannt. Auch bei der Kontrastfärbung lässt (4.) das Zufügen von

konzentrierter Zitronensäure anstelle von zehnprozentiger Weinsäure die Elementarkörperchen besser hervortreten (Pr. 22, 24 ff).

Die (5.) Formolfixierung wurde 1954 als Verbesserung der Einfachfärbung von HERZBERG vorgeschlagen. Verbessert sie auch die Kontrastfärbung? Das ist die Titelfrage dieser Arbeit. Erstes Teilergebnis: Sicher farbverstärkend wirkt sie bei der Kontrastfärbung nach HERZBERG auf die Elementarkörperchendarstellung, und zwar dann, wenn gleichzeitig dem Viktoriablau Zitronen- statt Weinsäure zugesetzt wird (Pr. 53 f u. andere), ohne Zitronensäure nicht (Nr. 20 folgende).

Bisher war von notwendigen Versuchen die Rede, das Virus kräftiger anzufärben. Naturgemäss ist bei einer Färbung in Etappen das färberische Gesamtergebnis in Gefahr, wenn versucht wird, eine Farbkomponente - hier das Viktoria-blau - zu verstärken. Als gefährdet erwies sich im Verlaufe der Untersuchungen zunächst das Kernechtrot.

Wurde am Schlusse der Kontrastfärbung Viktoriablau mit Zitronensäurezusatz fünf Minuten lang angewendet und wie üblich nach der Grünfärbung mit Weinsäure gebeizt, so fiel die Rotfärbung zu schwach aus (Pr. 24 ff). Auch ein Verkürzen der Färbedauer des Viktoriablaues half dem nicht ab (Pr. 31 ff). Es zeigte sich, dass Kernechtrot unter Säureeinwirkung abzublassen scheint (Pr. 43 ff). Ohne die Weinsäurebeizung (Handlung 5 der Originalvorschrift) ergaben sich gute Präparate (Nr. 52 u. andere). Wichtigstes Ergebnis der Kernechtrotversuche: Die Formolfixierung scheint auf die Rotfärbung eher günstig zu wirken (Pr. 20 f, 53 ff).

Im Gegensatz zum Kernechtrot wird die Lichtgrünfärbung durch Säuren nicht negativ (Pr. 46 ff) sondern eher positiv beeinflusst (Weinsäurebeizung !). Die Formolfixierung scheint dagegen verschlechternd auf sie einzuwirken (Nr. 53 ff). Die heute erhältliche Farbe ist auffallend kräftig (Pr. 34 u. andere). Das könnte erklären, warum WINKLE trotz der Ungenauigkeit seines Zitates bei der von HERZBERG als Klippe der Färbung bezeichneten Differenzierung des Grün eine gute Kontrastfärbung erhalten hat.

Es ist ein grosser Vorteil der Formolfixierung bei der Einfachfärbung, dass man einen klareren Ausstrichgrund erhält. Bei den oben beschriebenen Versuchen mit der Kontrastfärbung wurde eine solche vorteilhafte Wirkung der Formolfixierung nicht deutlich.

Wenn wir zusammentragen, was bisher über die Beeinflussung der Kontrastfärbung durch Vorbehandeln mit Formolpuffer ausgesagt wurde, so ergibt sich folgende Antwort auf die Titelfrage. Die Formolfixierung wirkt farbverstärkend auf die Elementarkörperchendarstellung, wenn gleichzeitig dem Viktoriablauf Zitronensäure zugesetzt wird. Auf die Färbung mit Kernechtrot scheint sie sich auch günstig, auf die Lichtgrünfärbung eher ungünstig auszuwirken. Der bei der Einfachfärbung gefundene Vorteil eines klareren Ausstrichgrundes ist bei der Kontrastfärbung nicht deutlich.

Im Verlauf der Untersuchung wurde die Kontrastfärbung, wie ausführlich dargetan, ein wenig modifiziert. Die beste Modifikation (Pr. 52) liess sich nicht mit wünschenswerter Regelmässigkeit

reproduzieren (Pr. 57 ff), während ich schon als Ungeübter sofort gute Präparate mit der Einfachfärbung nach HERZBERG zustandegebracht habe (trotz der gegenteiligen Erfahrungen KÜHNs). Es besteht in dieser Hinsicht eine ähnliche Beziehung wie zu dem alten Karbolfuchsinverfahren nach PASCHEN, das ebenfalls technisch kompliziert ist.

Die Bemühungen um eine Kontrastfärbung virusinfizierter Zellen erscheinen durchaus gerechtfertigt. Die Viruskontrastfärbung nach HERZBERG hat zum ersten Male Zellplasma, Zellkern und Elementarkörperchen mit distinkten eigenen Farbwerten (Plasma grün, Kern lachsrosa, Elementarkörperchen amethystviolett) dargestellt. Bemerkenswert ist auch, dass sich das Plasma der infizierten Zelle, lichtgrün zu Beginn, im weiteren Verlauf mehr und mehr violett anfärbt. Die Darstellbarkeit der Elementarkörperchen mit Viktoriablau neben Strukturen anderer eigener Farbtönung weist auf den Lipoproteidgehalt des Virus hin.

Es ergaben sich gute, aber nicht entscheidend bessere Präparate als 1934. Die Formolfixierung wirkt sich bei der Kontrastfärbung teils günstig aus, teils nicht. Ihre Anwendung stellt deshalb keine entscheidende Verbesserung des alten Verfahrens dar. Der Abbildung in der Originalarbeit (9) gleiche Bilder liessen sich auch mit der Formolfixierung erreichen. Es handelt sich bei der Viruskontrastfärbung mit oder ohne Formolfixierung um ein schönes, aber diffiziles Färbeverfahren, das in einem nicht näher bestimmbaren Prozentsatz zu einem guten mikroskopischen Bilde führt.

Zusammenfassung.

1. Untersucht wurde die Auswirkung der Formolpuffer-Fixierung auf die Kontrastfärbung nach HERZBERG am Beispiel der Kanarienvögel.
2. 73 Präparate von neun Vögeln wurden gefärbt.
3. Die Methode war der Literatur zu entnehmen.
4. Es ergaben sich gute, aber nicht entscheidend bessere Präparate als 1934.
5. Die Formolfixierung verstärkt die Elementarkörperchenfärbung, wenn dem Viktoriablau Zitronensäure zugesetzt wird.
6. Für die Kernechtrotfärbung ist die Fixierung ebenfalls günstig, für die Lichtgrünfärbung eher ungünstig.
7. Der Ausstrichgrund erscheint nicht auffallend klarer.
8. Heute ist anscheinend kräftigeres Lichtgrün im Handel als 1934.
9. Es wird eine Modifikation der Kontrastfärbung im einzelnen angegeben; diese lieferte mir gute Präparate, aber nicht mit der wünschenswerten Regelmässigkeit.
10. Die Viruskontrastfärbung mit oder ohne Formolfixierung wird als ein schönes aber diffiziles Färbeverfahren bezeichnet, das in einem nicht näher bestimmbar Prozentsatz zu einem guten mikroskopischen Bilde führt.

Literaturverzeichnis.

1. D o e r r, R., und H a l l a u e r, C.,: Handbuch der Virusforschung. Springer-Verlag, Wien, seit 1938.
2. D o m a g k, G.,: Ein Beitrag zu den Kernechtfärbungen und der Haltbarkeitsmachung empfindlicher Färbungen. Zbl. allg. Path. 55, 248 bis 250 (1932).
3. D o w n i e, A. W.,: zitiert nach Herzberg (17).
4. H a r m s, H.,: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort 1957 bis 1959.
5. H e n n e b e r g, G., und K ö h l e r, H., (Herausgeber): Praktikum der Virusdiagnostik. G. Fischer-Verlag, Stuttgart (1961). VIII + 110 S.
6. H e r r l i c h, A.,: zitiert nach Herzberg (17).
7. H e r z b e r g, K.,: Kultur und mikroskopische Darstellung des von Kikuth beschriebenen Vogelvirus. Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 130, 183 bis 188 (1933).
8. Ders.: Mikrophotographische Darstellung einer intrazellulären Virusentwicklung. Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 130, 326 bis 329 (1933).
9. Ders.: Viktoriablauf zur Färbung von filtrierbarem Virus (Pocken-, Varizellen-, Ektromelia- und Kanarienvogelvirus). Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 131, 358 bis 366 (1934).
10. Ders.: Viktoriablauf zur Färbung filtrierbarer Vira. Klin. Wschr. 1934, 381.

11. Ders.: Zur Sichtbarmachung filtrierbarer Vira.
Klin. Wschr. 1934, 1363.
12. Ders.: Über die färberische Darstellung einiger
Virusarten (Elementarkörperchen) unter beson-
derer Berücksichtigung der intracellulären Ver-
mehrungsvorgänge. (Vom 2. Internationalen Mikro-
biologenkongress, London 1936, angeforderter
Beitrag in etwas erweiterter Fassung.) Klin.
Wschr. 1936, 1385 bis 1389.
13. Ders. im Handbuch der Viruskrankheiten, Bd. I,
S. 17 bis 60. Verlag G. Fischer, Jena 1939.
14. Ders.: Eine Ergänzung der Viktoriablau-Färbung.
Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 160, 481 bis 485
(1954).
15. Ders.: Erleichterungen beim Nachweis des Pocken-
virus im mikroskopischen Präparat. Bemerkungen
zu einer gleichlautenden Arbeit von Otto Kühn.
Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 173, 177 bis 184
(1958).
16. Ders.: Licht- und elektronenmikroskopische Be-
funde am Kanarienspockenvirus. Archiv für Experi-
mentelle Veterinärmedizin 14, 75 bis 83 (1959).
17. Ders.: Die Technik der Elementarkörperchen-
Färbung des Pocken- und Vaccine-Virus mit Vik-
toriablau 4 R. Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 177,
145 bis 148 (1960).
18. K i k u t h, W.,: Ueber ein filtrierbares Virus
bei einer übertragbaren Kanarienvogelkrankheit.
Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 127, 185 bis 187
(1933).
19. Ders. und G o l l u p, H.,: Versuche mit einem
filtrierbaren Virus bei einer übertragbaren Ka-
narienvogelkrankheit. Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. -
125, 313 bis 320 (1932).

20. K ü h n, O.,: Erleichterungen beim Nachweis des Pockenvirus im mikroskopischen Präparat. Zbl. Bakt. - Abt. I Orig. - 168, 480 (1957).
21. L i p s c h ü t z, B.,: zitiert nach Harms.
22. M ü l l e r, R.,: Medizinische Mikrobiologie. (Lehrbuch der Hygiene, Teil II.) 2. Aufl. Lehmann-Verlag München und Berlin (1944). X + 456 S.
23. N a g e l, J.,: Vergleichende Viktoriablaufärbungen bei den Erregern der Geflügelpocke, der Kanarienvogelkrankheit und der Variola-Vakzine. Diss. Düsseldorf (1936).
24. R u s k a, H.,: Virus. Darmstadt o. J. (Vorwort von 1950.) 64 S. + Beilage.
25. W i n k l e, St.,: Mikrobiologische und serologische Diagnostik mit Berücksichtigung der Pathogenese und Epidemiologie. 2. Aufl. G. Fischer-Verlag Stuttgart (1955). 320 S.

Weitere Literaturangaben im Text.

Tabelle.

Präparat Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Wässerung und Trocknung.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formolfixierung.														
Rotfärbung (Handlung 1).	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wässerung und Trocknung (2).	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grünfärbung (3).	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+
Wässerung 2mal 5 Sek. (4),	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2mal 4 Sek.														
Weinsäurebeizung (5).	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wässerung 2mal 5 Sek. (6),	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2mal 4 Sek.														
Verd. Viktoriabl. m. Weinsre.,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mit konz. Zitronensäure,														
mit verd. Zitronensäure;														
Einwirkungszeit 20 Sek. (7),	+	+	+	+	+	+	+	+				+		
30 Sek.,									+				+	
1 Min.,										+	+			
2 Min.,														
3 Min.,														+
5 Min.														
Wässerung 2mal 5 Sek. (8),	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
2mal 4 Sek.													+	+

Präparat Nr.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Wässerung und Trocknung.			+											
Formolfixierung.	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rotfärbung (Handlung 1).	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+
Wässerung und Trocknung (2).	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+
Grünfärbung (3).	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+
Wässerung 2mal 5 Sek. (4),														
2mal 4 Sek.	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+
Weinsäurebeizung (5).	+	+					+			+		+	+	+
Wässerung 2mal 5 Sek. (6),														
2mal 4 Sek.	+	+					+			+		+	+	+
Verd. Viktoriabl. m. Weinsre.,														
mit konz. Zitronensäure,				+				(+)			(+)		+	
mit verd. Zitronensäure;	+	+	+		+									+
Einwirkungszeit 20 Sek. (7),														
30 Sek.,														
1 Min.,														
2 Min.,														
3 Min.,														
5 Min.	+	+	+	+	+			+			+		+	+
Wässerung 2mal 5 Sek. (8),														
2mal 4 Sek.	+	+	+	+	+			+			+		+	+

Lebenslauf.

Am 28. Juli 1934 wurde ich in Frankfurt a. M. geboren. 1940 bis 1943 Besuch der Volksschule in Kriescht (Neumark) in der Heimat meines Vaters, des Diplom-Volkswirts Helmut Hildebrandt. Meine Mutter hatte sich dort als Praktische Ärztin niedergelassen. 1943 bis 1945 Internatschüler des Musischen Gymnasiums Frankfurt am Main.

1945 bis 1954 Schüler der Hermann Billung-Schule Celle (Niedersachsen), wo ich die Reifeprüfung ablegte. Nach zwei Semestern Medizin an der Universität Göttingen absolvierte ich eine bankkaufmännische Lehre in Hannover. Abschlussprüfung vor der dortigen Industrie- und Handelskammer.

Anschliessend nahm ich mein Medizinstudium wieder auf. Studienorte : Göttingen (3. bis 5. Semester, Physikum 1958), Wien (6. Semester), Zürich (7. und 8. Semester) und Frankfurt am Main (9. bis 11. Semester). In Frankfurt habe ich am 7. August 1962 das Staatsexamen mit "gut" bestanden.

Seit September 1962 bin ich Medizinalassistent, seit Juli 1963 verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren : die Professoren v. Albertini, Amelung, Amsler, Artelt, Bachmann, Betke, Blechschmidt, Bleuler, Böni, Boetticher, Brockmann, Brücke, Brunner, Chiari, Deuticke, Draheim, Fanconi, Fellingner, Firbas, Flammersfeld, Frey, Frey-Bolli, Froewis, v. Gierke, Glemser, Gloor, Gloor-Meyer, Graff, Graumann, Gruber, Güntz, Hadorn, Harder, Hartmann, Hauberg, Held, Heller, Henke, Herrmann, Herzberg, Hilsch, Ferd. Hoff, Hollmann, Holtz, Kahlau,

Kramer, Lapp, Lauda, Leibholz, Lieb, Lindner, Luff, Mahrenholz, Mannkopf, Ed. Meyer, Mittermaier, Mooser, H. Neumann, Ortmann, Piepho, Rajewsky, v. Reckow, Rosemann, Rosenmund, Rossier, Rotter, Rüedi, Rüttner, de Rudder, Schinz, Schönbauer, Schrade, Schumann, Schwenzer, Stange, Starck, Storck, Strnad, Thiel, Uehlinger, Weisse, Zollinger, Zutt; die Doktoren v. Baumgarten, Binswanger, Buckel, Fries, Gerson, Grüneis, Grüner, Habermann, Hedinger, Hellriegel, Henatsch, Huber, Landes, Lange, Lochner, Luther, Neumann, Salem, Schlegel, Schmith, Schwartzkopff, Steinmann, Ullrich, Verrey, Weber, Wiedemann und Zimmermann.

Ehrenwörtliche Erklärung

gemäss § 13 der Promotionsordnung.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt a. M. zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Wie wird die Virus-kontrastfärbung durch gepufferte Formollösung beeinflusst?" im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt a. M. unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Herzberg mit Unterstützung durch die Medizinisch-technische Assistentin Frau Lück und Herrn Dr. med. Reuss ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe ¹⁾ Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Dortmund, den 11. Dezember 1963.

¹⁾ ausser den folgenden : 1. K o c h, w.,: Die Doktorarbeit. Anleitung... Max Hueber-Verlag München (1956).
2. Die im Verlag Felix D i e t r i c h erschienene Bibliographie der Deutschen Zeitschriften-Literatur.
3. Periodica medica. Titelabkürzungen medizinischer Zeitschriften. Thieme-Verlag Stuttgart.

gez. Peter Hildebrandt.

